

Title	Notch Signals Inhibit the Development of Erythroid/Megakaryocytic Cells by Suppressing GATA-1 Activity through the Induction of HES1
Author(s)	石河, 江里
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45393">https://hdl.handle.net/11094/45393</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 いし へ 江 り

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19299 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 Notch Signals Inhibit the Development of Erythroid/Megakaryocytic Cells by Suppressing GATA-1 Activity through the Induction of HES1 (Notch の標的分子 HES1 による赤巨核球細胞の分化抑制機構の解析)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 金 倉 謙

(副査)

教 授 青 笹 克 之 教 授 仲 野 徹

## 論 文 内 容 の 要 旨

## [目的]

細胞膜貫通型 Notch レセプターはマウスの胎児発生に必須で、神経芽細胞や筋芽細胞など種々の細胞の運命決定において重要な役割を果たす。造血機構においても造血幹細胞上に発現する Notch はストローマ細胞上の Notch リガンドの刺激をうけ、造血幹細胞を未分化な状態で維持し、自己複製を促すことが報告されてきたが、そのメカニズムは明らかではない。本研究では、Notch シグナルが赤芽球・巨核球の分化増殖に及ぼす影響及びその分子機構について検討した。

## [方法ならびに成績]

ヒト赤白血病株 K562 細胞に Notch1 の恒常的活性型 Notch1-IC、estradiol で Notch1 活性が誘導される Notch1 とエストロゲン受容体のキメラ分子 Notch1/ER を導入した。Notch1-IC 導入クローンは空ベクターを導入した Mock クローンとほぼ同様の増殖曲線を示し、Notch1/ER 導入クローンを estradiol 処理しても細胞増殖は影響されなかった。一方、Notch1 導入クローンや estradiol 処理をした Notch1/ER 導入クローンでは Mock クローンと比較して、赤芽球系のマーカー GlycophorinA の発現が低下していた。K562 は TPA に反応して巨核球へ分化するが、Notch1/ER 導入クローンを estradiol 存在下で TPA 処理した場合、巨核球への分化は起こらず Bcl-XL の発現低下を伴うアポトーシスが誘導された。このクローンに Bcl-XL を過剰発現させると TPA によるアポトーシスは回避されたが、巨核球への分化は依然として阻害されていた。

赤芽球・巨核球系への分化においては転写因子 GATA-1 が必須の役割を担うことから、Notch シグナルが GATA-1 の活性に及ぼす影響について検討した。293T 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行うと、GATA-1 によるレポータージーンの活性化は、Notch シグナルの下流分子である RBJ- $\kappa$  の活性型 RBJ-VP16 や Notch の標的分子の一つ HES1 によって抑制された。一方、HES1 のファミリー分子 HES5 は GATA-1 の活性に影響しなかった。また、Notch1-IC、RBJ-VP16、HES1 を導入した K562 のクローンでは Mock クローンと比較して GATA-1 の活性が抑制され、RBJ-VP16、HES1 導入クローンでは、Notch1-IC 導入クローンと同様に TPA 処理によりアポトーシスが誘導された。また、Notch1/ER 導入クローンに GATA-1 活性を回復させると、estradiol 存在下でも TPA に反応して巨核

球に分化するようになった。これらの結

[総評]

従来より、Notch シグナルが造血幹細胞の未分化能の維持や自己複製に関わることが報告されてきたが、その分子機構の詳細については明かではなかった。

本研究においては、Notch シグナルが造血細胞の系統決定やその後の分化課程に深く関わる系統特異的転写因子の一つである GATA-1 に及ぼす影響について検討が行われた。その結果、Notch のシグナルが、標的分子 HES1 の発現誘導を介して GATA-1 と p300 の結合を阻害し GATA-1 のアセチル化を抑制し、転写活性化能を阻害することにより、赤芽球・巨核球系の分化を阻害することが明らかにされた。従来、Notch の標的分子である HES1 は、神経系や筋肉系細胞の分化に関わる転写因子 MASH1 や MyoD のヘテロ 2 量体のパートナー E47 と Helix-Loop-Helix 構造を介して結合し、これらの分子の機能を阻害することによって、細胞分化を抑制することが報告されてきた。上述のように、本研究結果は、HES1 が造血細胞の分化を抑制する際には、神経系、筋肉系とは全く異なる機構を介していることを明かとしたものであり、その学術的価値は極めて高いと考えられる。また、造血幹細胞以外の幹細胞システムにおいても、それぞれの分化に関わる転写因子に対して Notch シグナルや HES1 が同様の機構で作用している可能性も示唆され、本研究は他の細胞系の幹細胞研究に対しても貴重な知見を供すると考えられる。

また、本研究結果は、現在国内外の多くの研究室において試みられている造血幹細胞の *in vitro* での増幅法の確立に極めて有用な情報であると考えられる。

以上の点から、本研究成果は学位に値するものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

従来より、Notch シグナルが造血幹細胞の未分化能の維持や自己複製に関わることが報告されてきたが、その分子機構の詳細については明かではなかった。

本研究においては、Notch シグナルが造血細胞の系統決定やその後の分化課程に深く関わる系統特異的転写因子の一つである GATA-1 に及ぼす影響について検討が行われた。その結果、Notch のシグナルが、標的分子 HES1 の発現誘導を介して GATA-1 と p300 の結合を阻害し GATA-1 のアセチル化を抑制し、転写活性化能を阻害することにより、赤芽球・巨核球系の分化を阻害することが明らかにされた。従来、Notch の標的分子である HES1 は、神経系や筋肉系細胞の分化に関わる転写因子 MASH1 や MyoD のヘテロ 2 量体のパートナー E47 と Helix-Loop-Helix 構造を介して結合し、これらの分子の機能を阻害することによって、細胞分化を抑制することが報告されてきた。上述のように、本研究結果は、HES1 が造血細胞の分化を抑制する際には、神経系、筋肉系とは全く異なる機構を介していることを明かとしたものであり、その学術的価値は極めて高いと考えられる。また、造血幹細胞以外の幹細胞システムにおいても、それぞれの分化に関わる転写因子に対して Notch シグナルや HES1 が同様の機構で作用している可能性も示唆され、本研究は他の細胞系の幹細胞研究に対しても貴重な知見を供すると考えられる。

また、本研究結果は、現在国内外の多くの研究室において試みられている造血幹細胞の *in vitro* での増幅法の確立に極めて有用な情報であると考えられる。

以上の点から、本研究成果は学位に値するものと考えられる。